

# ヒトにおける異種反応性自然抗体(抗 Gal 抗体)産生B細胞の解析

著者	後藤 昌史
学位授与機関	Tohoku University
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/54879">http://hdl.handle.net/10097/54879</a>



ヒトにおける異種反応性自然抗体(抗 $\alpha$ Gal抗体)産生  
B細胞の解析

東北大学大学院医学系研究科外科学第二講座移植免疫学専攻

後藤 昌史



ようやく我が国においても臓器移植が開始され、今後臓器移植が外科治療の一手段として不動の地位を確立していくことは明白だが、既に数例では移植後の移植臓器の不足が問題となっており、こういった問題を解決するために、動物からの移植臓器においては異種

## ヒトにおける異種反応性自然抗体(抗 $\alpha$ Gal抗体)産生 B細胞の解析

異種反応性自然抗体(以下XNA)及び抗体によって引き起こされる超急性拒絶反応が大きな問題となっているが、それにもかかわらず、XNAを産生するヒトB細胞そのものの分布や特徴について研究は未だ明らかではない。本研究では、我々が従前に開発した、ブタサイログロブリンと磁気ビーズを使用する方法を用いて、ヒトXNAを産生するB細胞を分離し、その分布や特徴を調べることを目指し、組織形質、CD5発現率、表面イムノグロブリンのアイソタイプ、CD45発現率に関する解析を行った。その結果、ヒトのXNA産生B細胞はラットと異なり、特に脾臓に多く存在するわけではなく、またCD5発現のものが多いわけではないことが判明した。さらに、表面イムノグロブリンとしてIgD・IgMを発現しているものが多く、またほとんどの細胞がCD19陽性であったことから、成熟B細胞ではあるが、ナイーブな細胞であるものが多いということが示唆された。本研究において、ヒトのXNA産生B細胞の解析が可能となり、それにより超急性拒絶反応が抑制され、ブタからヒトへの臓器移植の実現へ向け大きな前進となることは間違い無いと思われる。

東北大学大学院医学系研究科外科学第二講座移植免疫学専攻

後藤 昌史



## 要約

ようやく我が国においても脳死移植が開始され、今後臓器移植が外科治療の一手段として不動の地位を確立していくことは明白だが、既に欧米では慢性的な移植臓器の不足が問題となっており、こういった問題を解決するために、21世紀の移植医療においては異種移植が欠かせないものであると思われる。生理学的・解剖学的条件から、ヒトへの臓器提供動物として、ブタが最も適しているとされているが<sup>1,2,3</sup>、この系の異種移植においては、異種反応性自然抗体（以下XNA）及び補体によって引き起こされる超急性拒絶反応が大きな障壁となっている<sup>4,5,6,7,8</sup>。それにもかかわらず、XNAを産生するヒトB細胞そのものの分布や特徴について詳細は未だ明らかではない<sup>9</sup>。この研究では、我々が独自に考案したブタサイログロブリンと磁気性ビーズを使用する方法を用いて、ヒトXNAを産生するB細胞を分離し、その分布や特徴を調べることを目的に、臓器別局在、CD5発現率、表面イムノグロブリンのアイソタイプ、CD45発現率につき検討を行った。その結果、ヒトのXNA産生B細胞はラットと異なり、特に脾臓に多く存在するわけではなく、またCD5陽性のものが多いわけではないことが判明した。さらに、表面イムノグロブリンとしてIgD・IgMを発現しているものが多く、またほとんどの細胞がCD45RA陽性であったことから、成熟B細胞ではあるが、ナイーブな状態にあるものが多いということが示唆された。本研究においてはここまでにとどまったが、今後さらにこれらB細胞の特徴を明らかにし、特異的抑制が可能となれば、異種反応性自然抗体産生そのものの特異的抑制が可能となり、それにより超急性拒絶反応が抑制され、ブタからヒトへの異種移植の実現へ向け大きな前進となることは間違いないと思われる。



## 研究背景

ようやく我が国においても脳死患者からの臓器摘出が行われ始め、今後いっそう臓器移植という医療が、外科治療の一手段として不動の地位を確立していくことは明白であると思われる。しかし、我が国の宗教的背景等を考慮してみても、脳死患者からの臓器移植が広く国民のコンセンサスを得て普及するには、まだかなりの年月を要するものと思われ、移植臓器の絶対的不足状態を解消するには程遠いと言えよう。一方、欧米においては、臓器移植は既に一般外科治療の一手段としての地位を確立しており、この事実が移植例数の増加をもたらし、ひいては慢性的な移植臓器の不足状態をもたらしている。こういった問題を解決するために、人工臓器の開発があげられるが、現在のところ、複雑なヒトの臓器の機能を全て補うような完全な人工臓器の完成はまだ望めない。そこでもう一つの解決法として、異種動物の臓器を移植臓器として使用する、異種移植があげられる。異種移植の利点としては、レシピエントが必要な時にいつでも無尽蔵に移植臓器を入手できること、生体臓器移植のように健常人にメスをいれる必要がないこと、他人の死を待つというような脳死の概念にとらわれなくてすむこと等があげられる。これまでも既に、今世紀初頭よりヒヒ、サル、チンパンジー、ヒツジ、ブタ、ヤギといった異種動物より、のべ47例の心・腎・肝移植が行われてきたが（その中で、後で述べるdiscordant 異種移植に相当するものが8例）、最長生存は9ヶ月にとどまり、そのほとんどは数時間～数日以内に拒絶されてしまうという結果に終わっている<sup>10</sup>。しかし、異種移植に関するここ数年の基礎的研究は驚く程進歩しており、異種移植はもはや単なる興味の対象ではなく、いくつ



かのハードルさえ超えれば、現実の医療となり得るものである事がわかってきたため、世界各国においてその実用へ向けた研究が盛んに行われている。現在のところ、生理学的・解剖学的条件から、ヒトへの臓器提供動物として、ブタが最も適しているとされているが<sup>1,2,3</sup>、この系においては、移植後数分から数時間以内にグラフトが血行の途絶により壊死に陥ってしまうという、超急性拒絶反応が起こることが知られている<sup>4,5,6,7,8</sup>。近年の研究により、この超急性拒絶反応は、グラフト上のオリゴ糖鎖末端のGalactose  $\alpha$  1,3 Galactose鎖 ( $\alpha$ Gal抗原) を標的として、ヒト血清中に大量に存在する異種反応性自然抗体 (XNA) と、補体の働きによってグラフトの血管内皮が障害を受け、血栓を形成する結果起こることがわかってきた<sup>6,11-18</sup>。このように超急性拒絶反応が起こる組み合わせの異種移植をdiscordant異種移植といい、起こらない組み合わせをconcordant異種移植という。 $\alpha$ Gal抗原は、new world monkey 以下の全ての哺乳類の至る所に発現していることが知られているが<sup>14,19,20</sup>、逆にいえばこれを発現していない、発生学的にヒトと極めて近い霊長類であるヒヒやold world monkeyをドナーとして用いれば、concordantな組み合わせとなり、超急性拒絶反応は回避できることになる。しかし、これらは繁殖力が弱く絶対数を確保できない上に道義的問題を伴い、現実的には諦めざるを得ない。したがって異種移植を現実のものとするためには、まずこの超急性拒絶反応の壁を破る必要があり、そのため現在世界中で実に様々な方面から研究されているわけだが、なかなか克服できないというのが実状であり、特に根幹を成す異種反応性自然抗体を産生するヒトB細胞そのものの体内における分布や特徴については、詳細は未だ全く明らかではない。これまでも特殊な性質を有するB細胞として自己抗体産生B細胞やCD5陽性B細胞等が知られている。もしそれらとの関わりを調べることにより、こういった異種反応性自然抗体産生B細胞の特徴を明らかにすることができれば、異種反応性自然抗体の特異的抑制が可能と



なり、それによる超急性拒絶反応の抑制により異種移植の実現へ向け、大きな前進となることは間違いなく、非常に意義深いものといえる。

### 研究目的

ラットにおいては、異種反応性自然抗体を産生するB細胞が、とりわけ脾臓に多く存在するということが報告されている<sup>21</sup>。また、ヒトにおいても自己自然抗体産生が、CD5陽性のB細胞に多く認められることから、異種反応性自然抗体を産生するB細胞にもCD5陽性のものが多いのではないか、という推測が以前よりなされている<sup>6,22,23</sup>。そこで本研究においては、ヒトにおける異種反応性自然抗体を産生するB細胞の、体内における分布や特徴を明らかにするために、我々が独自に考案したブタサイログロブリンと磁気性ビーズを使用する方法を用いて、これらB細胞そのものを分離し、以下の項目について検討する。

- 1, ヒトにおいてもラットと同様に、異種反応性自然抗体産生B細胞は脾臓に多く存在するのか？
- 2, 従来言われているように、ヒトの異種反応性自然抗体産生B細胞には、本当にCD5陽性のものが多いのか？
- 3, それらヒトの異種反応性自然抗体産生B細胞の、表面イムノグロブリンのアイソタイプに何か特徴は見られないのか？
- 4, ヒトの異種反応性自然抗体産生B細胞における、CD45RA・ROの発現はどのようになっているのか？



4番目のCD45に関しては、自己自然抗体産生B細胞とCD45RAの発現状況に相関関係が見られるという報告があること<sup>24</sup>、及びT細胞においてであるが、naive cellがCD45RAを発現するのに対し、CD45ROは全く発現しないこと<sup>25,26</sup>等を踏まえ、検討を行うこととした。

## 研究方法

### リンパ球の分離

研究目的 1 の、ヒトにおける異種反応性自然抗体産生B細胞の体内における局在の検討を行うため、1997年3月から、1998年5月の間に摘出された、脾臓8例、扁桃7例、及び健常なボランティアの末梢血16例を対象として実験を行った。患者の原疾患のうちわけは、脾摘を要した症例は全例胃癌に伴うものであり、極度に進行している症例は対象外とした。また扁桃摘を要した症例は、全例扁桃肥大によるものであった。いずれにおいても、自己免疫疾患を合併する症例は対象外とし、また患者の同意を得た上で使用させて頂いた。検体の性質上、全くの正常者からの入手は不可能であり、また目的とする異種反応性自然抗体の局在に関し、早期の胃癌や扁桃肥大が影響を及ぼすものとは考えにくいと思われた。研究目的 2、3 及び 4 の検討に際しては、同様の条件下に得られた末梢血をそれぞれ8例、もしくは6例対象として実験を行った。脾臓・扁桃は、まず被膜を剥がし、ハサミにて細切した後、メッシュ越しにすり潰し、得られた溶液をよく遠心攪拌した上で細胞浮遊液とした。末梢血は、1%FCS入りphosphate-buffered saline (PBS) にて希釈し細胞浮遊液とした。こうして得られた細胞浮遊液をFicoll-Paque PLUS



( Pharmacia, Uppsala, Sweden ) にて遠心分離を行い、リンパ球を分離した。

#### ヒトにおける異種反応性自然抗体産生 B 細胞の選択分離

こうして得られたリンパ球全体の中から、異種反応性自然抗体産生 B 細胞を選択するために、我々は B 細胞の表面イムノグロブリンを介した抗原特異的な binding を利用し、磁気性ビーズによって分離するという独自の方法を考案した<sup>27</sup>。これまでも B 細胞の表面イムノグロブリンを介して抗原特異的な細胞を選択する方法として、panning や FAC sorting 法等が報告されているが<sup>28</sup>、これらの方法に比べ我々の方法は簡便・迅速であり、かつ分離精度が高いという利点を備えている。具体的には、まず数個の  $\alpha$  Gal 抗原を側鎖末端に持つブタのサイログロブリン (Sigma, Saint-Louis, MO) を 0.05M borate buffer pH 9.5 に 150  $\mu$ g/ml となるように溶解し、それを無標識ビーズである tosyl activated magnetic beads (DynaL, Oslo, Norway) 15mg に最終濃度が 75  $\mu$ g/ml となるように室温で 24 時間混ぜ合わせる。こうして得られたブタサイログロブリン付着ビーズと、既に分離してあるリンパ球とを、4℃ にて 60 分 incubate させた後、マグネットが備え付けてあるスタンドに約 2 分静置する。ビーズがマグネット側のチューブ壁に完全に付着したところで、残りの溶液を完全に吸引除去する。異種反応性自然抗体産生 B 細胞の選択率をより高めるために、同様の操作を 4 回繰り返した。こうして得られた異種反応性自然抗体産生 B 細胞を、37℃・5%CO<sub>2</sub> 条件下に一晩放置し、ビーズより分離した上で、研究目的 1 から 4 の各検討を行った。

#### ブタサイログロブリンに対する抗体の $\alpha$ Gal 抗原への特異性の検証



異種反応性自然抗体産生B細胞の選択にあたり、ブタサイログロブリンを使用した理由は以下の通りである。(1) 側鎖末端に数個の $\alpha$ Gal抗原を持つことが確認されている<sup>29</sup>。(2) 比較的安価で安定したものが手に入る。(3) 以前より、ヒト血清の異種反応性を有意に低下させることが判明している<sup>17</sup>。(4) ブタサイログロブリンを吸着させたカラムによって得られる異種反応性自然抗体は、 $\alpha$ -Gal抗原に対するspecificityを有している。4番目に列挙した、抗ブタサイログロブリン抗体の $\alpha$ -Gal抗原に対する特異性を検証するために、マウスラミニン (Sigma) を抗原とし、ブタサイログロブリンを付着させたカラムによって得られる抗ブタサイログロブリン抗体を一次抗体に用いた、酵素標識免疫測定法 (ELISA法) を行った。マウスラミニンは、末端に $\alpha$ -Gal抗原を持つ糖鎖を約50-70個と豊富に有する糖蛋白であり<sup>30,31</sup>、マウスラミニンに対する反応は、ほぼ100% $\alpha$ Gal抗原に対するものであるということが、文献上報告されている<sup>32</sup>。それを $\alpha$ -ガラクトシダーゼ及び $\beta$ -ガラクトシダーゼで処理した上で反応させ、測定結果を比較することにより、この抗体の $\alpha$ -Gal抗原に対する特異性が確認できるものと考えた。尚、プレートに固相化した抗原を直接酵素溶液で処理した場合、液相での処理と全く変わらない結果が得られることは報告済みである<sup>17</sup>。まず、20mU/mlのGreen Coffee Beans  $\alpha$ -ガラクトシダーゼ (Sigma), Jack Beans  $\beta$ -ガラクトシダーゼ (Sigma) 溶液と内因性の蛋白分解酵素による抗原性の変化を除くため1.0 $\mu$ g/mlのaprotinin, 0.5mg/mlのEDTA-Na<sub>2</sub>, 10 $\mu$ g/mlのleupeptin, 1.0mg/mlのpefabloc SC, 10 $\mu$ g/mlのpepstatin (Boehringer Mannheim) の蛋白分解酵素阻害剤混合液を用意した。ガラクトシダーゼ、蛋白分解酵素阻害剤の希釈には0.15 M Na-acetate buffer pH 5.0を使用した。96穴ELISAプレート (FALCON 3915, Becton - Dickinson) の各wellに、



50mM bicarbonate buffer pH 9.6 で希釈した $10\mu\text{g/ml}$ のマウスラミニンを $50\mu\text{l}$ ずつ入れ、 $4^{\circ}\text{C}$ で一晩放置し抗原を張り付けた。そこへ $\alpha$ -ガラクトシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、陽性対照群としてPBSを滴下し、ラミニンを張り付けていないwellを陰性対照群とした。すべてのwellに蛋白分解酵素阻害剤混合液を滴下し、 $37^{\circ}\text{C}$ で24時間混ぜ合わせた。 $0.05\%$  Tween-20 PBS にて5回洗浄した後、blockingのため各wellに $3\%$  ウシ血清アルブミン (BSA) を $250\mu\text{l}$ ずつ入れ、室温で2時間放置した。さらに5回洗浄した後、一次抗体として抗サイログロブリン抗体を滴下し、室温で3時間 incubation 行った。5回の洗浄の後、二次抗体としてALP conjugated anti human IgM, IgG (DAKO, Copenhagen, Denmark) を1000倍希釈し各wellに $100\mu\text{l}$ ずつ加え、室温にて2時間放置した。5回の洗浄後、ジエタノールアミンpH9.8に溶解した Sigma 104 phosphatase substrate (Sigma) を各wellに $100\mu\text{l}$ ずつ加え、 $405\text{nm}$ の吸光度を Easy Reader EAR 340 (SLT-Lab Instruments) にて測定した。

#### EB ウイルス transformによる、選択分離されたB細胞における異種反応性自然抗体産生の検証

選択分離されたB細胞における異種反応性自然抗体産生の検証を行うため、対照群として anti CD19 monoclonal antibody conjugated magnetic beads (Dyna, Oslo, Norway, 以下 CD19 beadsと略す) によって得られるB細胞を用い、各々に同条件下に Epstein-Barr (EB) ウイルスをtransformさせ、異種反応性自然抗体産生陽性wellの割合をELISAにて比較検討した。まず B95-8 marmoset cell line を $10^5/\text{ml}$ になるように $10\%$ ウシ胎児血清 (FCS) 入りRPMI 1640 medium にて希釈し、 $10^{-7}\text{M}$  PMAを



加えて2週間培養した上で上清を回収し、これを EB ウイルス sup として使用した<sup>33</sup>。ブタサイログロブリンビーズ及びCD19ビーズによって選択分離されたB細胞 $1 \times 10^6$ 個に対し、このEB ウイルス sup を各々5mlずつ加え、37℃、5%CO<sub>2</sub> 条件下に1.5時間 incubate 行った。尚、CD19ビーズによって選択分離されたB細胞の純度については、ほぼ100%であることを FACScan cell analyzer (Becton - Dickinson) によって確認した。incubate 後、遠心して上清を交換した上でcell countを行い、 $5 \times 10^3$ /wellとなるように96 well 平底 プレート (FALCON 3072、Becton - Dickinson) に100 wellずつ細胞をまいた。EB ウイルス transform B細胞の抗体産生の至適濃度は、 $1 \times 10^4$ /well であるが、1つの検体より得られる異種反応性自然抗体産生B細胞数の限度、及び比較検討のため100wellを要した事により、今回我々は $5 \times 10^3$ /wellという条件にて実験を行った。週2回の割合で培地交換を行い、11日目における各wellの上清を回収し、マウスラミニンを使用した同様のELISAにて異種反応性自然抗体産生の有無を確認した。ELISAにおいては、一次抗体として正常ヒト血清を加えた群を陽性対照群、PBSを加えた群を陰性対照群とし、基質投与6時間後のO.D値が1.0以上のwellを異種反応性自然抗体産生陽性wellと判定した。その上で、ブタサイログロブリンビーズ及びCD19ビーズによって選択分離されたB細胞各々における陽性wellの割合を算出し、比較検討を行った。

#### ブタサイログロブリンビーズによって選択分離された、異種反応性自然抗体産生 B 細胞の解析

ブタサイログロブリンビーズによって選択分離された、異種反応性自然抗体産生 B 細胞



の解析を行うために、FACScan cell analyzer を使用し、研究目的1から4の項目について検討を行った。解析ソフトには、CELLQuest (Becton - Dickinson) を使用した。まず選択分離した異種反応性自然抗体産生 B 細胞、及び対照群として分離前のヒトリンパ球をそれぞれ  $0.5 \times 10^6$  ずつ用意し、0.5%BSA及び0.1%NaN<sub>3</sub>入りPBSにてよく洗浄した後、R-Phycoerythrin (R-PE) coujugated anti CD20 monoclonal antibody (mAb) (Dako) 、fluorescein isothiocyanate (FITC) coujugated anti CD5 mAb (Immunotech、Marseille、France) をそれぞれに加え、4℃にて45分 incubate 行った。再びよく遠心洗浄を行い、最終的に300  $\mu$ l の溶液とした上で FACScan cell analyzer にか、研究目的2の項目につき検討を行った。研究目的 3 及び 4 の項目については、FITC coujugated anti CD5 mAb の代わりにそれぞれ FITC coujugated anti IgM, IgD, IgG mAb (MBL、Nagoya、Japan) 及び FITC coujugated anti CD45RA (Immunotech) , CD45RO mAb (Immunotech) を加え検討を行った。研究目的1の項目については、各臓器における分離前のリンパ球、及び分離選択された細胞数をそれぞれ実際に検鏡にてカウントし、FACScan cell analyzer の CD20 陽性率の結果をもとに、全B細胞中の異種反応性自然抗体産生 B 細胞の存在率を以下の式より算出し、比較検討を行った。

各臓器における異種反応性自然抗体産生 B 細胞の存在率 (%) =

$$\{ (\text{分離選択された細胞数} \times \text{CD20 陽性率}) / (\text{分離前のリンパ球} \times \text{CD20 陽性率}) \} \times 100$$

#### 統計処理



研究目的1の統計処理には、One-way Factorial ANOVA 及び Unpaired t-testを使用した。研究目的2から4の統計処理には、Unpaired t-testを使用した。 $p < 0.05$ を統計学的有意とした。

## 研究結果

### 異種反応性自然抗体産生 B 細胞の選択分離結果

ブタサイログロブリンビーズによる、選択分離前後のヒトリンパ球の組成を FACScan cell analyzer にて解析した結果を図 1 に示す。図 1 aに見られるのが、ブタサイログロブリンビーズによる選択分離を行う前の、ヒトリンパ球全体の組成を示したものであるが、T細胞、NK細胞、B細胞と思われる細胞群が混在していることが確認される。図1b,c に見られるのが、ブタサイログロブリンビーズによる選択分離後の、ヒトリンパ球の組成を示したものである。まず図1bが、FITC coujugated anti CD3 mAb (Dako) ・ R-PE coujugated anti CD56 mAb (Dako) の2 color で染めた結果であるが、これによると、ほぼ全ての細胞がダブルネガティブであり、したがってT細胞やNK細胞ではないことがわかる。図1cが R-PE coujugated anti CD20 mAb (Dako) で染めたものであるが、これによりほぼ全ての細胞がB細胞であることがうかがえる。

### ブタサイログロブリンに対する抗体の $\alpha$ Gal 抗原への特異性の検証結果

図 2 に示してあるように、マウスラミニンを  $\alpha$  ガラクトシダーゼによって処理し、 $\alpha$  ガラ



クシド結合を加水分解した際には、ヒト血清、ブタサイログロブリン付着カラムによって得られる抗ブタサイログロブリン抗体のいずれも完全に反応が阻害され、一方対照群である $\beta$ ガラクトシダーゼによる処理では反応は全く阻害されなかった。蛋白分解酵素阻害剤による抗原性の変化はほぼないものと考えられ、またこれに対する抗体の反応を認めなかった。以上より、マウスラミニンと反応するヒト血清中の抗体はラミニンの $\alpha$ Gal抗原に特異的に結合する抗体であり、抗ブタサイログロブリン抗体は $\alpha$ Gal抗原に特異的な抗体であることが確認された。

#### EB ウイルス transform による、選択分離されたB細胞における異種反応性自然抗体産生の検証結果

ブタサイログロブリンビーズを使用して選択分離されたB細胞と、CD19ビーズを使用して選択分離された通常のB細胞に、それぞれEBウイルスをtransformし、異種反応性自然抗体産生陽性wellの割合をELISAで比較した結果を図3に示す。通常のB細胞の方は、EBウイルスをtransformした全well中、10%のみが異種反応性自然抗体産生陽性であったが、ブタサイログロブリンビーズで得られたB細胞の方は、44%のwellが異種反応性自然抗体産生陽性を示した。分離した細胞群における陽性率が期待をやや下回ったことは、分離できる細胞数の限界より、各wellに $5 \times 10^3$ 個の細胞しか撹けなかったこと、及び分離操作に伴う物理的、時間的な細胞へのダメージが影響したものと思われる。

#### 〈研究目的1〉 ブタサイログロブリンビーズにより得られた、異種反応性自然抗体産生B細胞の、脾臓・末梢血・扁桃における存在割合の比較結果



ヒトにおける異種反応性自然抗体産生B細胞は、特に脾臓に多いという事はなく、むしろ末梢血中に有意に多く見られ、その存在割合は、全B細胞の約0.5から2%であった。

(図4)

#### 〈研究目的2〉 異種反応性自然抗体産生B細胞中のCD5陽性率

ヒトにおける異種反応性自然抗体産生B細胞中のCD5陽性率は40.04%であり、同じ検体の全B細胞中の陽性率である35.54%と比べ、有意な差は認められなかった。したがって、CD5陽性のものが特に多いわけではないことが判明した。(図5)

#### 〈研究目的3〉 ヒトにおける異種反応性自然抗体産生B細胞の表面イムノグロブリンのアイソタイプに関する検討結果

図6の左に示したグラフが、異種反応性自然抗体産生B細胞上の表面IgGの発現率を比較検討した結果であるが、異種反応性自然抗体産生B細胞上の表面IgG強陽性率は20.2%であり、同じ検体の全B細胞中の強陽性率である27.3%と比べ、有意な差は認められなかった。次に図6中央に示したグラフが、表面IgMの発現率を比較検討した結果であるが、全B細胞中の強陽性率は10.32%にとどまったのに対し、異種反応性自然抗体産生B細胞においては、46.09%であり、有意に高値を示した。図6右に示したグラフが、表面IgDの発現率を比較検討した結果であるが、全B細胞中の強陽性率は11.38%であるのに対し、異種反応性自然抗体産生B細胞においては67.29%であり、これも有意に高値を示した。



したがって、ヒトの異種反応性自然抗体産生B細胞には、表面イムノグロブリンとして、IgD、IgMを発現しているものが多いことが判明した。

(4図) 〈研究目的4〉 異種反応性自然抗体産生B細胞におけるCD45RA及びCD45ROの陽性率

CD45RAに関する検討結果であるが、図7左に示してあるように、異種反応性自然抗体産生B細胞においては、実に94.37%が陽性を示しており、全B細胞中の陽性率である82.40%に比べ有意に高値を示した。次にCD45ROに関する検討結果であるが、図7右に示してあるように、全B細胞中の陽性率が24.24%であったのに対し、異種反応性自然抗体産生B細胞においては2.61%であり、逆に有意に低値を示した。

### 考察

ブタからヒトへといった discordant 異種移植において、未だ最も大きな障壁となっているのが超急性拒絶反応である。この超急性拒絶反応を克服するために、現在では、遺伝子工学の進歩を利用し、ドナーであるブタの臓器の $\alpha$ Gal抗原を遺伝子操作により抑制したり<sup>34-37</sup>、またヒト補体を不活性化するdecay accelerating factor (DAF) を移入したトランスジェニックブタを作成したりする試みがなされているが<sup>38</sup>、現時点では十分な成果は得られておらず、臨床応用にはまだまだ時間がかかるものと思われる。仮にそれらの方法がうまくいったとしても、そのためにかかる経費は莫大であり、またそのようにしてできたブタの臓器が、十分に機能するものであるかどうかははなはだ疑問であるといわざるを得ない。そういったことから、超急性拒絶反応を引き起こす主たる原因である異



種反応性自然抗体を産生するヒトB細胞そのものについて解析することは、この抗体の特異的抑制につながる可能性を秘め、非常に意義深いと考える。しかし、これまでヒトにおける異種反応性自然抗体産生B細胞そのものについては、ほとんど何もわかっていないというのが実状である。その最たる理由は、異種反応性自然抗体産生B細胞そのものの分離ができなかったことにある。そこで、我々はブタのサイログロブリンを付着した磁気性ビーズを使用して分離するという、非常に簡便かつ迅速な方法を独自に考案し、分離した細胞の解析を行った。選択分離された細胞がほとんどB細胞であったことから、我々が当初考えた通り、細胞表面の表面イムノグロブリンを介して選択分離されたものと思われる。この表面イムノグロブリンの特異性に関しては、ブタサイログロブリンをリガンドとしたアフィニティカラムによって得られた、抗サイログロブリン抗体を用いて検証したわけであるが、この抗体がマウスラミニンと強く反応したことから、この抗体がブタサイログロブリンとマウスラミニンに共通するエピトープに対するものであることがうかがえる。両者とも末端残基に $\alpha$ Gal抗原を多数発現していること<sup>29-31</sup>、またマウスラミニンを $\alpha$ ガラクトシダーゼで処理した場合のみこの抗体の反応が阻害されることより、この抗体は $\alpha$ Gal鎖に特異的な抗体であることがわかる。今回この方法によって算出された、全B細胞に占める異種反応性自然抗体産生B細胞の割合は0.5-2.0%という膨大な量であり、EBウイルス transformによる限界希釈法にて推定し、約1%であるとするGalili等の報告とほぼ一致する<sup>39</sup>。興味深いことに、ヒトに代表されるold world monkey 以上の霊長類は、生まれながらに血中に大量の異種反応性自然抗体を備えている<sup>14,15</sup>。その必然性や発生基序については、未だ解明されていないわけであるが、最近、これらの異種反応性自然抗体が、腸管における $\alpha$ Gal抗原を発現しているある種の細菌への交差反応によって生成されることが報告されている<sup>40</sup>。もしこのことが事実であれば、腸間膜リンパ節におけ



るこれら異種反応性自然抗体産生B細胞の割合が高くなっていることが推定されるため、今回の方法を用いて検索を試みたが、検索に必要な十分量の正常な腸間膜リンパ節を集めることが困難であり、この方法では難しいものと思われた。先にも述べたように、これらヒトにおける異種反応性自然抗体産生B細胞の局在についての報告は見当たらないが、以前よりラットにおいてはこれらのB細胞がとりわけ脾臓に多く存在すること<sup>21</sup>、また異種反応性自然抗体の産生にとって脾臓が重要な役割を担っていることが報告されている<sup>41</sup>。そこで我々の方法を用いて、ヒトにおける異種反応性自然抗体産生B細胞の局在につき検討してみたが、ラットの場合と異なり、特に脾臓に占める割合が多いわけではないことが判明した。

CD5陽性B細胞は、polyreactiveな自己自然抗体を、大量に生産することが以前より報告されている<sup>22,23</sup>。また異種反応性自然抗体もssDNA、dsDNA、bovine actin といった様々なmoleculesと反応するpolyreactiveな抗体であることが知られるようになってきた<sup>17,22,28,42,43,44</sup>。そういった事情から、このCD5陽性B細胞こそが異種反応性自然抗体産生B細胞の多くを占めているのではないかという推測がなされてきた。しかし、これには根拠が全く認められず、もしそうであれば治療上の戦略につながるという希望的推測によるところが大きかったものと思われる。実際、今回の我々の検証によって、特にCD5陽性のB細胞が多いわけではないことが確認できた。また、ラットにおいて超急性拒絶反応に大きくかかわるのは、IgM異種反応性自然抗体であり<sup>45,46,47</sup>、抗IgM抗体の大量投与によりこれは回避できるというグループがあるが<sup>48,49</sup>、今回の我々の検証によると、ヒトにおいても確かに異種反応性自然抗体産生B細胞の表面イムノグロブリンとしてIgMを発現しているものが多く認められたが、それと共にIgDを発現しているものも多く認め、またIgGを発現しているものも、少数ではあるが認めることができた。したがってヒトに



においては、IgM産生B細胞だけを破壊することでは、異種反応性自然抗体を完全に抑制することは不可能であると思われる。B細胞の表面イムノグロブリンは、未熟な間はIgMのみを発現しているが、成熟するに従いIgM・IgDの両方を発現し、活性化するに従いクラススイッチを行うことが知られている<sup>50,51</sup>。CD45に関しては、B細胞においてCD45ROを発現しているものは活性化されたものであるということ<sup>52,53</sup>、またT細胞においてであるが、naive cellがCD45RAを発現するのに対し、CD45ROは全く発現しないということが明らかとなっており<sup>25,26</sup>、先の表面イムノグロブリンの結果と合わせて考慮するに、ヒトにおける異種反応性自然抗体産生B細胞の多くは、成熟B細胞ではあるが、naiveな状態にあるものが多いということが推測できた。今回他にもCD86、CD40、HLA D-P,Q,RといったB細胞の表面マーカーをいくつか見当したが、個体間によるばらつきが大きく、また通常のB細胞との間に有意な差は認められなかった。今後さらなる研究によりこれらB細胞の特異的な性質を明らかにし、特異的抑制が可能となれば、異種反応性自然抗体産生そのものの特異的抑制が可能となり、それにより超急性拒絶反応が抑制され、ブタからヒトへの異種移植の実現へ向け大きな前進となることは間違いないと思われる。

## 結論

異種移植において未だ最も大きな障壁となっている、超急性拒絶反応を引き起こす異種反応性自然抗体を産生するB細胞そのものを解析するために、ブタサイログロブリンを付着した磁気性ビーズを使用し、選択分離した上で、FACSscan cell analyzeを行った。その結果、以下の結論を得た。

- 1、ヒトにおける異種反応性自然抗体産生B細胞の存在率は、特に脾臓において高くは



ないことが判明した。

- 2、 ヒトの異種反応性自然抗体産生B細胞には、とりわけCD5陽性のものは多くないことが確認できた。
- 3、 ヒトの異種反応性自然抗体産生B細胞には、表面イムノグロブリンとして、IgD・IgMを発現しているものが多いことが判明した。
- 4、 ヒトの異種反応性自然抗体産生B細胞の多くはCD45RA陽性であるが、逆にCD45ROを発現しているものはほとんど認められないことが判明した。

#### 参考文献

1. Cooper, DKC., Ye., Y., Rolf, L.L., Jr., Zuhdi N., The pig as a potential organ donor for man. In : Cooper DKC., Kemp E., Reemtsma K., White DJG., eds. Xenotransplantation :
2. Maki, T., O'Neil, J.J., Porter, J., et al. (1996) Porcine islets for xenotransplantation. Transplantation, 62, 136



3. Sachs, D.H., Leight, G., Cone, J., et al. (1976) Transplantation in miniature swine. *Transplantation*, 22, 559
4. Auchincloss, H.,J., (1988) Xenogeneic transplantation. A review. *Transplantation*, 46, 1
5. Calne, R.,Y., (1970) Organ transplantation between widely dispartespecies. *Transplant. Proc.*, 2, 550
6. Platt, J.,L., Vercellotti, G.,M., Dalmaso, A.,P., et al. (1990) Transplantation of discordant xenografts : a review of progress. *Immunol. Today*, 11, 450
7. Zhao, Z., Termignon, J.,L., Cardoso, J., Chereau, C., et al. (1994) Hyperacute xenograft rejection in the swine to human donor-recipient combination : in vitro analysis of complement activation. *Transplantation*, 57, 245
8. Schaapherder, A.,F., M.,R., Daha, Bulte, Mt., te., van, der, Woude, F.,j.,and H.,G., Gooszen. (1994) Antibody-dependent cell mediated cytotoxicity against porcine endothelium induced by a majority of human sera. *Transplantation*, 57, 1376



- 9, Yong, G.,Y., Emil, deGoma, Rolf, Barth, et al. (1998) B-cell reconstitution and xenoreactive anti-pig natural antibody production in severe combined immunodeficient mice reconstituted with immunocompetent B cells from varying sources. Transplantation, 66, 89
- 10, Denis, Lambrigts, David, H., Sachs, Cooper, DKC., (1998) Discordant Organ Xenotransplantation in Primates. Transplantation, 66, 547
- 11, Cooper, DKC., Good, A.,H., Koren, E., et al. (1993) Identification of  $\alpha$ -galactosyl and other carbohydrate epitopes that are bound by human anti-pig antibodies : relevance to discordant xenografting in man. Transplant. Immunol., 1, 198
- 12, Sandrin, M.,S., Vaughan, H.,A., Dabkowski, P.,L., et al. (1993) Anti-pig IgM antibodies in serum react predominantly with Gal  $\alpha$ 1,3Gal epitopes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 90, 11391
- 13, Oriol, R., Ye., Y., Koren, E., Cooper DKC., (1993) Carbohydrate antigens of pig tissues reacting with human natural antibodies as potentials targets for hyperacute vascular rejection in pig-to-man



organ xenotransplantation. *Transplantation*, 56, 1433

- 14, Galili, U., Clark, M.,R., Shohet, S.,B., et al. (1987) Evolutionary relationship between the natural anti-Gal antibody and the Gal  $\alpha$  1,3Gal epitope in primates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 84, 1369
- 15, Galili, U., (1993) Interaction of the natural anti-Gal antibody with  $\alpha$  galactosyl epitopes : a major obstacle for xenotransplantation in humans. *Immunol. Today*, 14, 480
- 16, Sandrin, M.S., McKenzie, I.F., (1994) Gal  $\alpha$  1,3Gal, the major xenoantigen recognised in pigs by human natural antibodies. *Immunol. Rev.*, 141, 169
- 17, Satake, M., Kawagishi, N., Rydberg, L., et al. (1994) Limited specificity of xenoantibodies in diabetic patients transplanted with fetal porcine islet cell clusters. Main antibody reactivity against  $\alpha$ -linked galactose-containing epitopes. *Xenotransplantation*, 1, 89
- 18, Parker, W., Lateef, J., Everett, M.J., et al. (1996) Specificity of xenoreactive anti-Gal  $\alpha$  1,3Gal IgM for  $\alpha$ -galactosyl ligands. *Glycobiology*, 65,499



- 19, Galili, U., Rachmilewitz, E.A., Peleg, A., Flechner, I. (1984) A unique natural human IgG antibody with anti-  $\alpha$ -galactosyl specificity. J. Exp. Med., 160, 1519
- 20, Galili, U., Macher, B.A., Buehler, J., et al. (1985) Human natural anti-  $\alpha$ - galactosyl IgG. II. The specific recognition of  $\alpha$  1,3-linked galactose residues. J. Exp. Med., 162, 573
- 21, Soares, M., Beneden, R., Havaux, X., et al. (1994) Characterization of xenoreactive natural antibodies secreting cells in rats. Xenotransplantation, 1, 118
- 22, Turman, M.A., Casali, P., Notkins, A.L., et al (1991) Polyreactivity and antigen specificity of human xenoreactive monoclonal and serum natural antibodies. Transplantation, 52, 710
- 23, Casali, P., Notkins, A.L., (1989) CD5+ B lymphocytes, polyreactive antibodies and the human B-cell repertoire. Immunol. Today, 10, 364
- 24, Kasaian, M.T., Ikematsu, H., Casali, P., (1992) Identification and analysis of a novel human surface CD5- B lymphocyte subset



- producing natural antibodies. *The Journal of Immunology*, 148, 2690
- 25, Michie, C.A., Mclean, A., Alcock, C., et al. (1992) Lifespan of human lymphocyte subsets defined by CD45 isoforms. *Nature*, 360, 264
  - 26, Mackay, C.R., (1993) Immunological memory. *Adv. Immunol*, 53, 217
  - 27, Pitre, J., Moller, E., Satake, M., (1995) Immunoselection of human lymphocytes producing xenoreactive natural antibodies against Gal  $\alpha$  1,3Gal terminal residues. *Xenotransplantation*, 2, 271
  - 28, Casali, P., Inghirami, G., Nakamura, M., et al. (1986) Human monoclonals from antigen-specific selection of B-lymphocytes and transformation by EVB. *Science*, 234, 476
  - 29, Spiro, R.G., Bhoyroo, V.D., (1984) Occurrence of  $\alpha$ -D-galactosyl residues in the thyroglobulins from several species. *J. Biol. Chem.*, 259, 9858
  - 30, Arumugham, R.G., Hsieh, T.C.Y., Tanzer, M.L., et al. (1986) Structures of the asparagine-linked sugar chains of laminin.



- 31, Shibata, S., Peters, B.P., Roberts, D.D., et al. (1982) Isolation of laminin by affinity chromatography on immunobillized Griffonia simplicifolia I lectin. FEBS. Lett, 142, 194
- 32, Galili, U., Tibell, A., Samuelsson, B., et al. (1995) Increased anti-Gal activity in diabetic patients transplanted with fetal porcine islet cell clusters. Transplantation, 59, 1549
- 33, Inghirami, G., Nakamura, M., Balo, W.J.E., et al. (1988) Model for studying virus attachment : Identification and quantitation of Epstein Barr virus-binding cells by using biotinylated virus in flow cytometry. J. Virol., 62, 2453
- 34, Strahan, K.M., Preece, A.F., Xu. Y., et al. (1995) Antisense inhibition of pig  $\alpha$ 1,3galactosyl-transferase leads to a reduction in expression of the major target for human natural antibodies on pig vascular endothelial cells. Xenotransplantation, 2, 143
- 35, Sandrin, M.S., Foder, W.L., Cohnen, S., et al. (1996) Reduction of the major porcine xenoantigen Gal  $\alpha$ 1,3Gal by expression of  $\alpha$ 1,2



- fucosyltransferase. *Xenotransplantation*, 3, 134
- 36, Koike, C., Kanagi, R., Takuma, Y., et al (1996) Introduction of  $\alpha$ 1,2 fucosyltransferase and its effect on  $\alpha$ Gal epitopes in transgenic pig. *Xenotransplantation*, 3, 81
- 37, Chen, C.G., Fisicaro, N., Shinkel, T.A., et al. (1996) Reduction in Gal  $\alpha$ 1,3-Gal epitope expression in transgenic mice expressing human H-transferase. *Xenotransplantation*, 3, 69
- 38, White, D.J.G., Langford, G.A., Cozzi, E., et al. (1995) Production of pigs transgenic for human DAF : A strategy for xenotransplantation . *Xenotransplantation*, 2, 213
- 39, Galili, U., Anaraki, F., Thall, A., et al. (1993) One percent of human circulating B lymphocytes are capable of producing the natural anti-Gal antibody. *Blood*, 82, 2485
- 40, Galili, U., Mandrell, R.E., Hamadeh, R.M., et al. (1988) Interaction between human natural anti-  $\alpha$ -galactosyl immunoglobulin G and bacteria of the human flora. *Infection and Immunity*, 56, 1730



- 41, Reding, R., Soares, M., Baranski, A., et al. Preformed antibody and complement rebound after plasma exchange. Analysis of immunoglobulin isotypes and effect of splenectomy. Transplant. Immunol., (in press)
- 42, Guilbert, B., Dighiero, G., Avrameas, S., et al. (1982) Naturally occurring antibodies against nine common antigens in human sera. J. Immunol., 128, 2779
- 43, Casali, P., Burastero, S.E., Nakamura, M., et al. (1987) Human lymphocytes making rheumatoid factor and antibody to ssDNA belong to Leu-1+ B cell subset. Science, 236, 77
- 44, Nakamura, M., Burastero, S.E., Notkins, A.L., et al. (1988) Human monoclonal rheumatoid factor-like antibody from the CD5+ B cells are polyreactive. J. Immunol., 140, 4180
- 45, Platt, J.L., Fischel, R.J., Matas, A.J., et al. (1991) Immunopathology of hyperacute xenograft rejection in a swine-to-primate model. Transplantation, 52, 214
- 46, Dalmaso, A.P., Vercellotti, G.M., Fischel, R.J., et al. (1992)



- Mechanism of complement activation in the hyperacute rejection of porcine organs transplanted into primate recipients. *Am. J. Pathol.*, 140, 1157
- 47, Parker, W.R., Bruno, D., Holzknicht, Z.E, et al. (1994) Xenoreactive natural antibodies : isolation and initial characterization. *J. Immunol.*, 153, 3791
- 48, Soares, M.P., Latinne, D., Elsen, M., et al. (1993) In vivo depletion of xenoreactive natural antibodies with an anti-mu monoclonal antibody. *Transplantation*, 56, 1427
- 49, Soares, M.P., Lu. X., Havaux, X., et al. (1994) In vivo IgM depletion by anti-mu monoclonal antibody therapy : the role of IgM in hyperacute vascular rejection of discordant xenografts. *Transplantation*, 57, 1003
- 50, Vitteta, E.S., Uhr, J.W., IgD and B cell differentiation. (1977) *Immunol. Rev.*, 37, 50,
- 51, Decker, D.J., Boyle, N.E., Koziol, J.A., et al. (1991) The expression of the Ig H chain repertoire in developing bone marrow B-lineage cells.



J.Immunol., 146, 350

- 52, Jensen, G.S., Poppema, S., Mant, M.J., et al. (1989) Transition in CD45 isoform expression during differentiation of normal and abnormal B cells. *Int Immunol*, 1, 229
- 53, Afar, B., Merrill, J., Clark, E.A., (1991) Detection of lymphocytes subsets using three-color/single-laser flow cytometry and the fluorescent dye peridinin chlorophyll-a protein. *J. Clinical Immunol.*, 11, 254

#### 図の説明

- 図1. ブタサイログロブリンビーズによる選択分離前後の、ヒトリンパ球の組成の FACSscan cell analyzer による解析結果。 選択分離を行う前のリンパ球(図1a)は、T細胞、B細胞、NK細胞等の細胞群が混在しているが、選択分離後の細胞(図1b,c)はほぼ全てB細胞であることがうかがえる。
- 図2. 96well マイクロプレートにコートしたラミニンを $\alpha$ ガラクトシダーゼ及び $\beta$ ガラクトシダーゼで処理し、ヒト血清及び抗ブタサイログロブリン抗体液との反応



をELISAを用いて検討した。ラミニンを $\alpha$ ガラクトシダーゼで処理すると (A)、いずれにおいても反応はほとんど認められなくなり、一方 $\beta$ ガラクトシダーゼで処理した場合 (B) は、陽性対照群である (D) とほぼ同様の反応を示した。

図3. ブタサイログロブリンビーズ (PTg-beads) を使用して選択分離されたB細胞と、CD19ビーズを使用して選択分離された通常のB細胞に、それぞれEBウイルスをtransformし、異種反応性自然抗体産生陽性wellの割合をELISAで比較した。通常のB細胞の方は、EBウイルスをtransformした全well中、10%のみが異種反応性自然抗体産生陽性であったが、ブタサイログロブリンビーズで得られたB細胞の方は、44%のwellが異種反応性自然抗体産生陽性を示した。

図4. ブタサイログロブリンビーズにより得られた、異種反応性自然抗体産生B細胞の、脾臓・末梢血・扁桃における存在割合を検鏡によるcell count、及びFACScan cell analyzerの結果をもとに比較した。ヒトにおける異種反応性自然抗体産生B細胞は、脾臓 (n=8) ・末梢血 (n=16) ・扁桃 (n=7) においてそれぞれ0.85%、1.34%、0.65%を占めており、特に脾臓に多いという事はなく、むしろ末梢血中に有意に多く見られた。存在割合は、以下の式より算出し、各臓器における平均値で表した。誤差線は標準偏差を表している。各臓器における異種反応性自然抗体産生B細胞の存在率 (%) = { (分離選択された細胞数 × CD20 陽性率) / (PBMC × CD20 陽性率) } × 100

図5. 異種反応性自然抗体産生B細胞中のCD5陽性率を、FACScan cell analyzerの



結果をもとに、同じ検体における通常の全B細胞中における陽性率と比較した。  
ヒトにおける異種反応性自然抗体産生B細胞中のCD5陽性率は40.04%であり、  
通常の全B細胞中の陽性率である35.54%と比べ、有意な差は認められなかった。  
誤差線は標準偏差を表している。(n=8)

図6. 異種反応性自然抗体産生B細胞の表面イムノグロブリンのアイソタイプを、  
FACScan cell analyzerの結果をもとに、同じ検体における通常の全B細胞に  
おける結果と比較した。異種反応性自然抗体産生B細胞上の表面IgG強陽性率  
は、20.2%であり、同じ検体の全B細胞中の強陽性率である27.3%と比べ、有  
意な差は認められなかった(n=6)。表面IgMの発現率は、全B細胞中の強陽性  
率は10.32%にとどまったのに対し、異種反応性自然抗体産生B細胞においては、  
46.09%であり、有意に高値を示した(n=4)。表面IgDの発現率は、全B細胞  
中の強陽性率は11.38%であるのに対し、異種反応性自然抗体産生B細胞におい  
ては67.29%であり、これも有意に高値を示した(n=4)。誤差線は標準偏差  
を表している。

図7. 異種反応性自然抗体産生B細胞におけるCD45RA及びCD45ROの陽性率を、  
FACScan cell analyzerの結果をもとに、同じ検体における通常の全B細胞中  
における陽性率と比較した。ヒトにおける異種反応性自然抗体産生B細胞中の、  
CD45RA陽性率は実に94.37%であり、全B細胞中の陽性率である82.40%に比  
べ有意に高値を示した(n=6)。CD45RO陽性率は全B細胞中において24.24%  
であったのに対し、異種反応性自然抗体産生B細胞においては2.61%であり、逆



に有意に低値を示した ( $n=4$ )。誤差線は標準偏差を表している。



図1 選択分離前後のリンパ球の組成



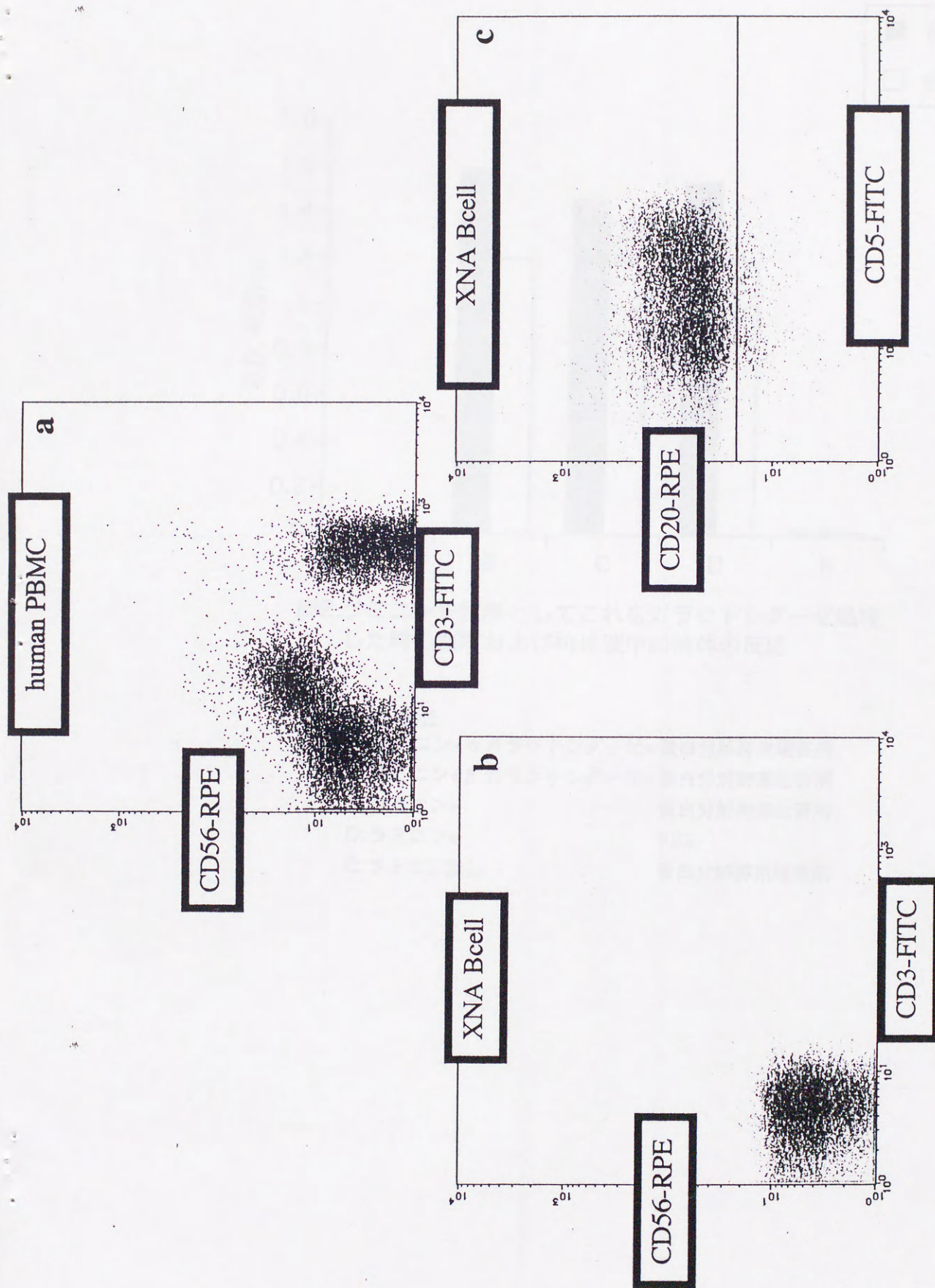


図1 選択分離前後のリンパ球の組成



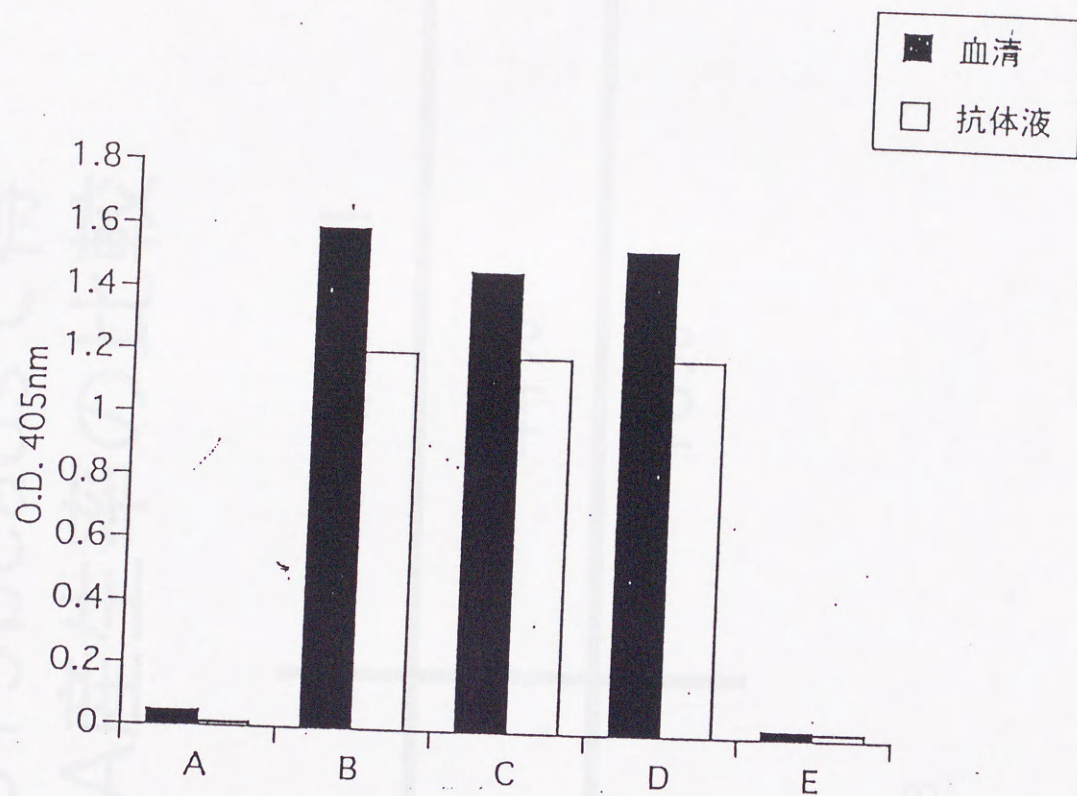


図2.ラミニンを抗原としてこれをガラクトシダーゼ処理した時の血清および抗体液中の抗体の反応

抗原処理法

- A: ラミニン+ $\alpha$ ガラクトシダーゼ+蛋白分解酵素阻害剤
- B: ラミニン+ $\beta$ ガラクトシダーゼ+蛋白分解酵素阻害剤
- C: ラミニン+蛋白分解酵素阻害剤
- D: ラミニン+PBS
- E: ラミニン無し蛋白分解酵素阻害剤



EBウイルスtransformによる、  
PTg-beads及びCD19beadsで得  
られるB-cellのXNA産生率の比較

	XNA陽性well
PTg-beadsで得られるB-cell	44%
CD19beadsで得られるB-cell	10%

図3



図4 脾臓・扁桃・末梢血における  
XNA存在割合の比較

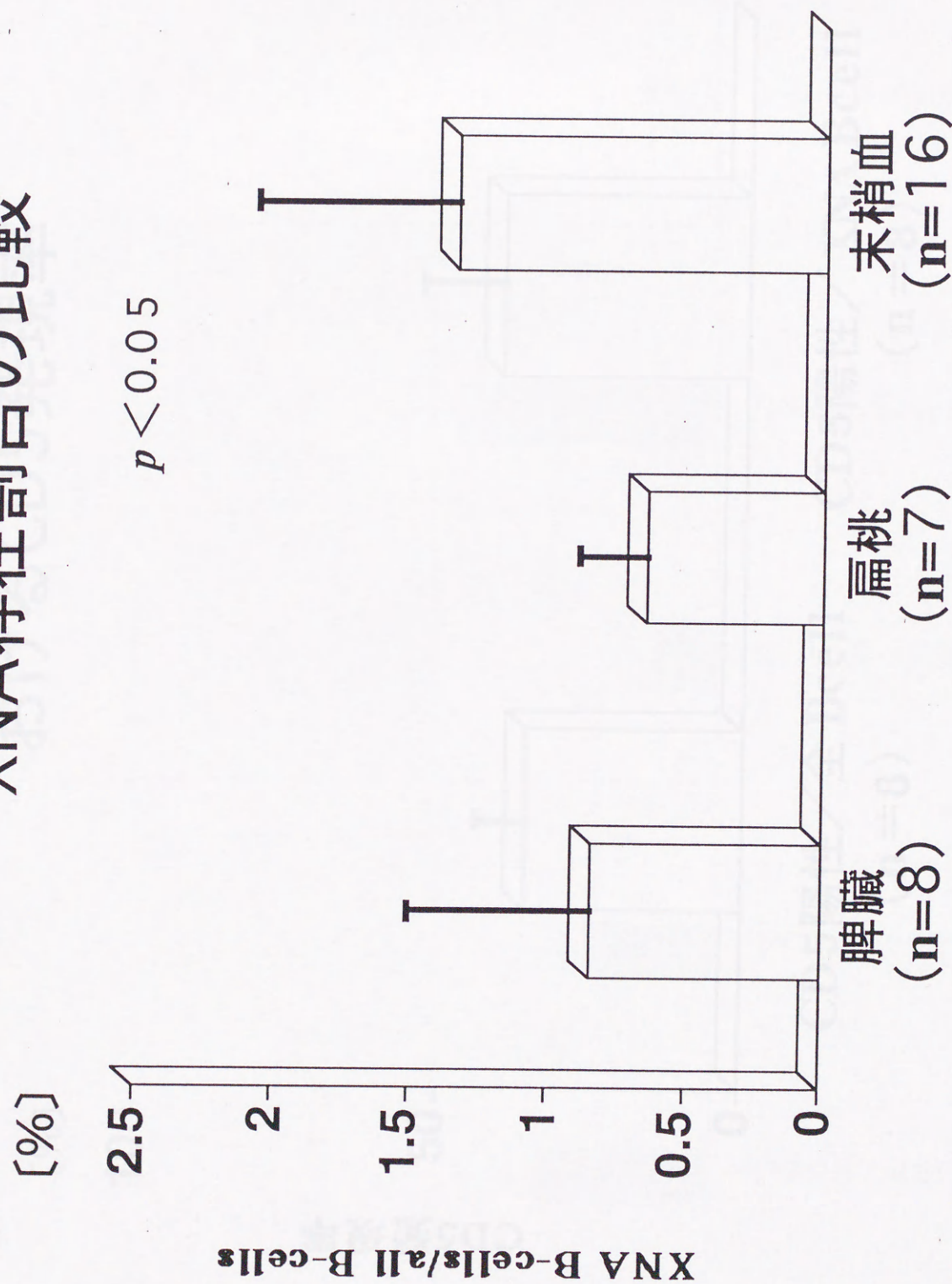




図5 全Bcell及びXNABcellに  
おけるCD5発現率

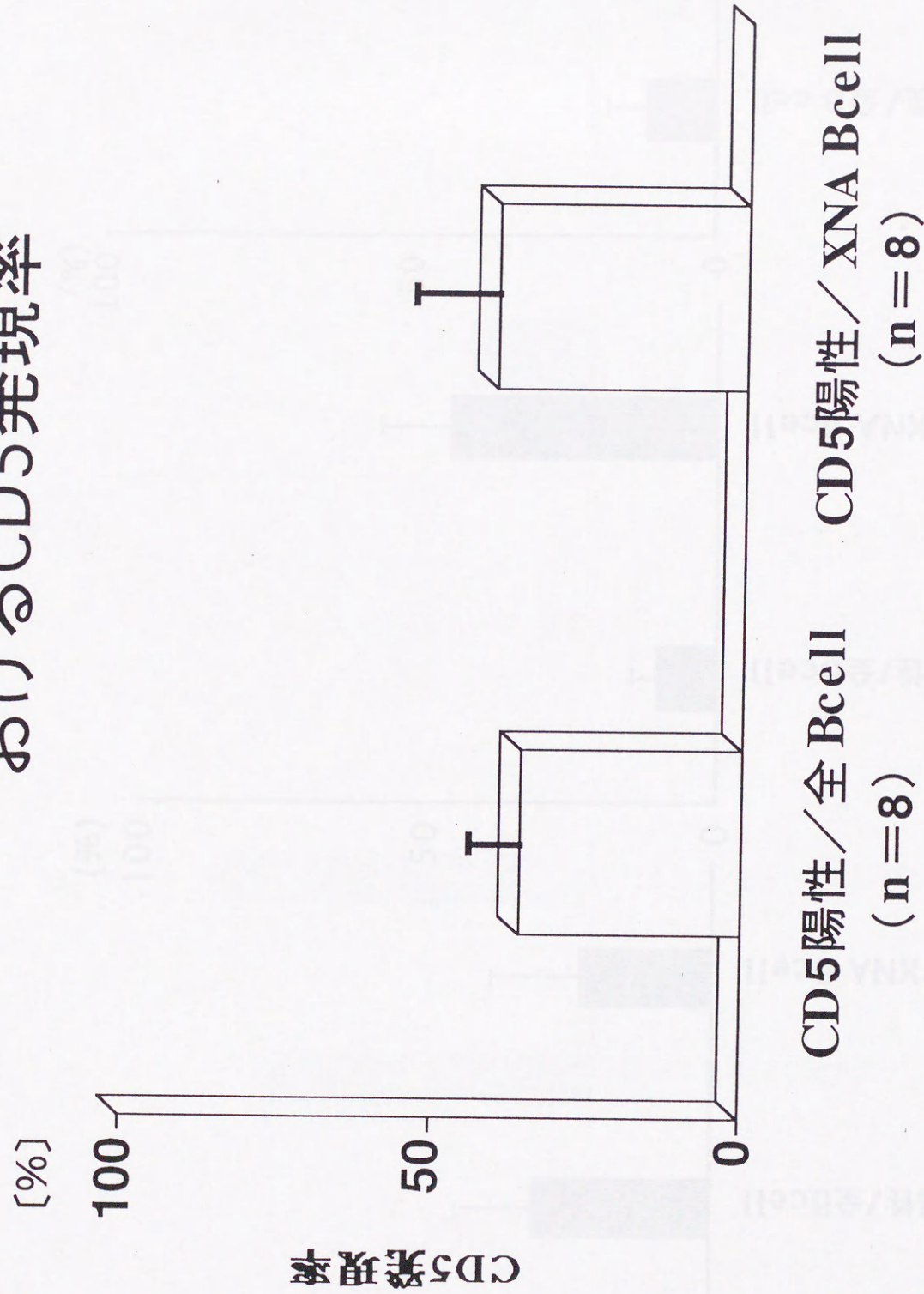




図6 全Bcell及びXNA Bcellにおける  
IgG・IgM・IgD発現率

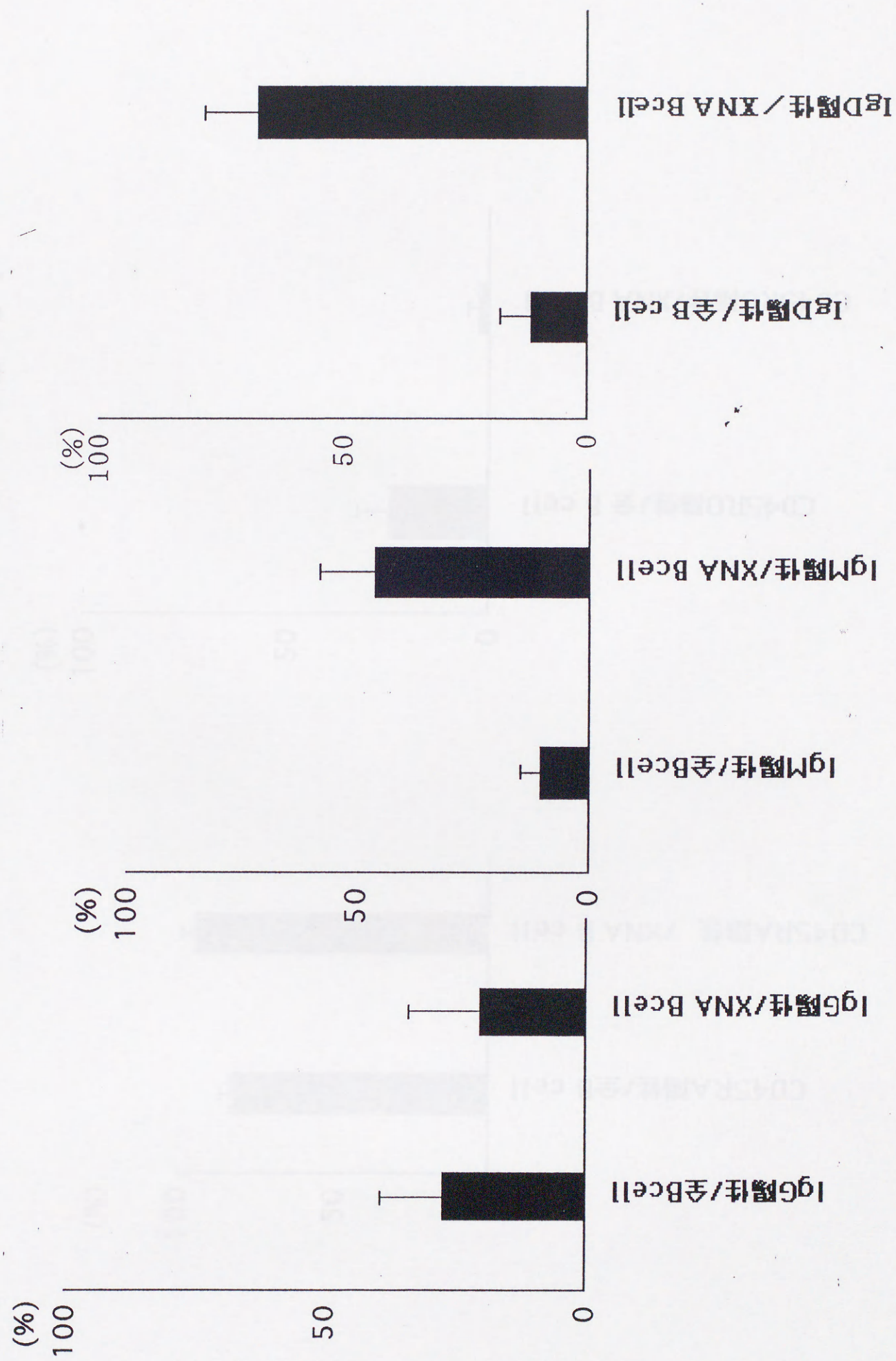
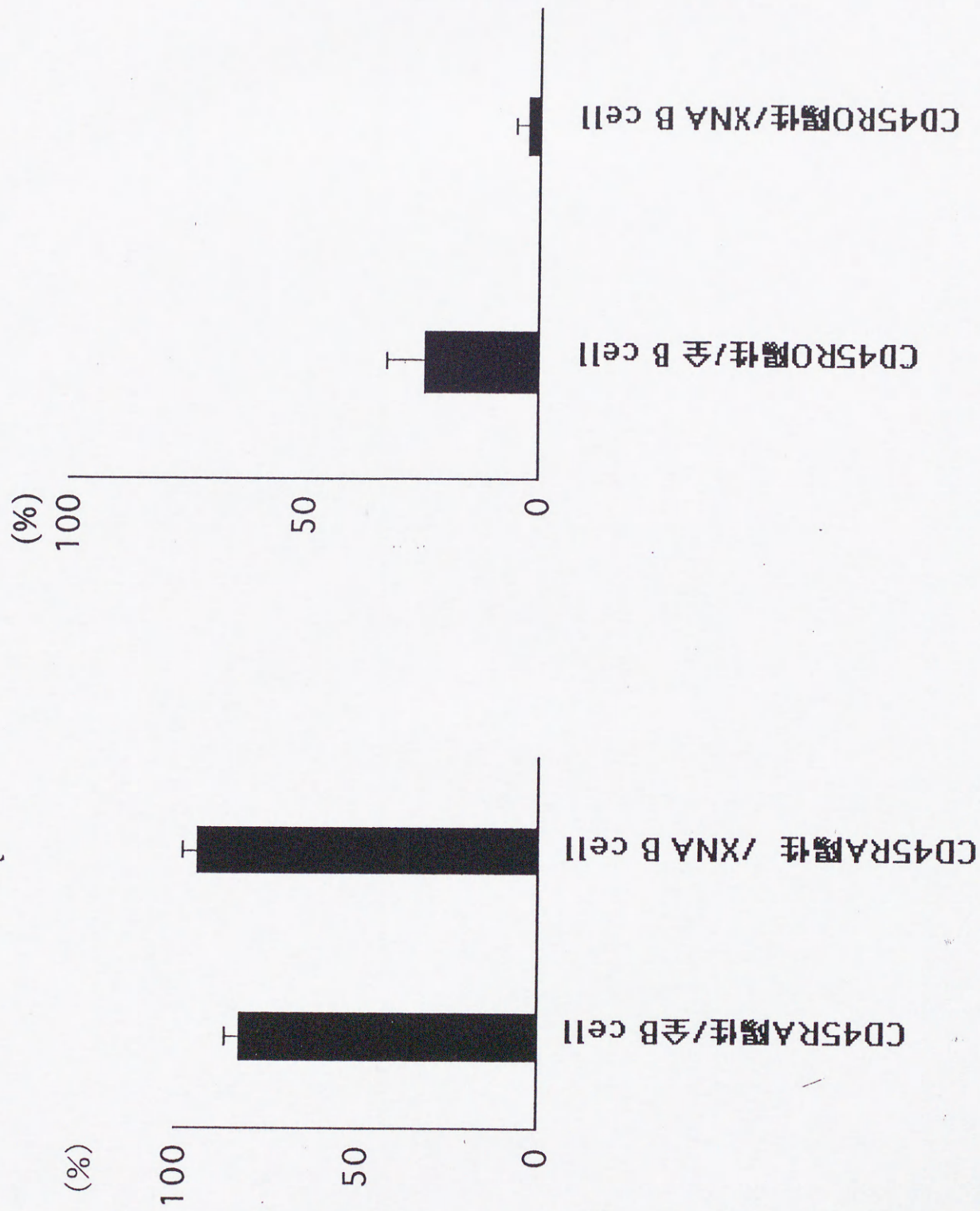
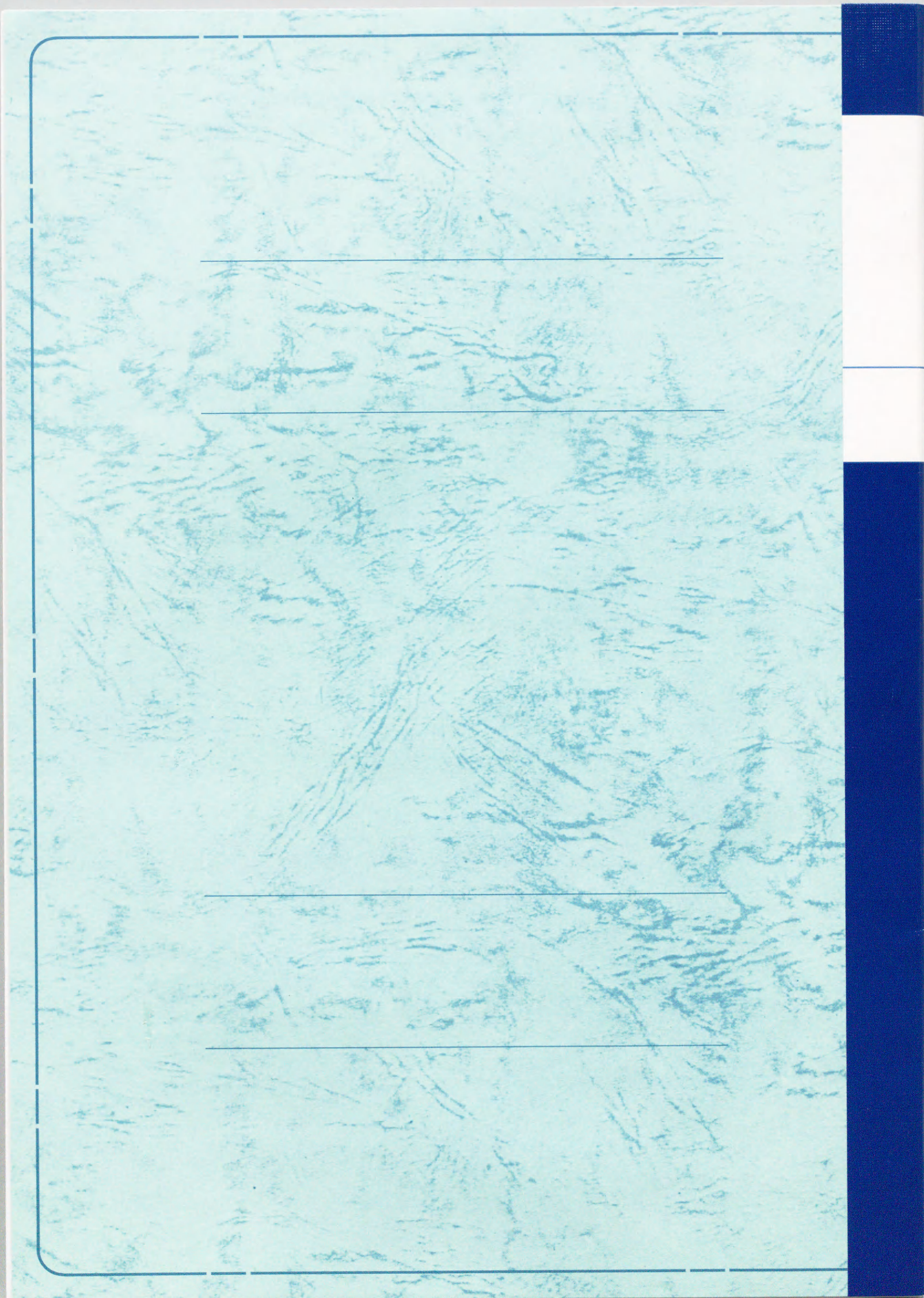




図7 全Bcell及びXNABcellにおける  
CD45RA・CD45RO発現率







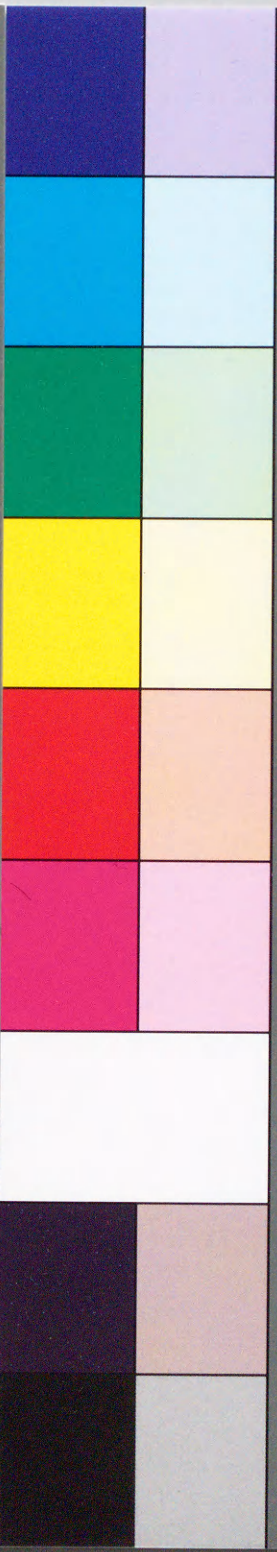


inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

# Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

